

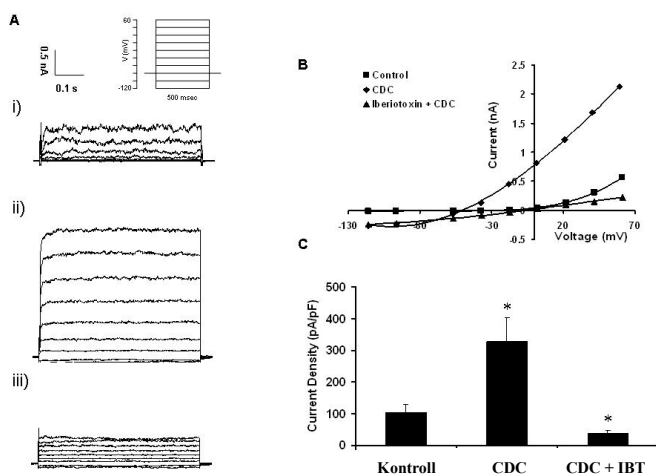
A pankreász duktális sejtek fő funkciója egy  $\text{HCO}_3^-$ -ban gazdag, izotónikus folyadék szekréciója, amely alapvető szerepet játszik az acinusok által termelt emésztőenzimek kimosásában illetve a gyomor felől érkező savas kémhatás neutralizálásában. Elégtelen vagy csökkent duktális ion- és folyadékszékrció a pankreász működésének zavaraihoz, illetve különböző betegségek (akut pankreatitisz, cisztás fibrózis) kialakulásához vezethet. Annak ellenére, hogy a duktális sejtek alapvető fontosságúak a normál környezet fenntartásában kevés irodalmi adat áll rendelkezésünkre a duktális sejtek működésére vonatkozóan fiziológiás és patofiziológiás körülmények között.

Ezért jelen projektben **célul** tűztük ki a pankreatitisz kiváltásában szerepet játszó etiológia faktor, az epe illetve a tripszin hatásának karakterizálását a duktális sejtekre ezen belül is elsősorban a  $\text{HCO}_3^-$  szekrécióra kifejtett hatásukat vizsgáltuk.

## I. Epesavak hatásának karakterizálása a pankreász duktális sejtek működésére

Korábbi kísérleteinkben kimutattuk, hogy a duktális sejtek luminális membránja felől adott kenodezoxikólsav (CDC; 0.1 mM) fokozza a duktális sejtek bikarbonát szekrécióját az intracelluláris kalcium emelésén keresztül. Kísérleteink elsődleges célja az volt, hogy megvizsgáljuk, hogy mely iontranszporterek, ioncsatornák vesznek részt ezen stimulált szekrécióban.

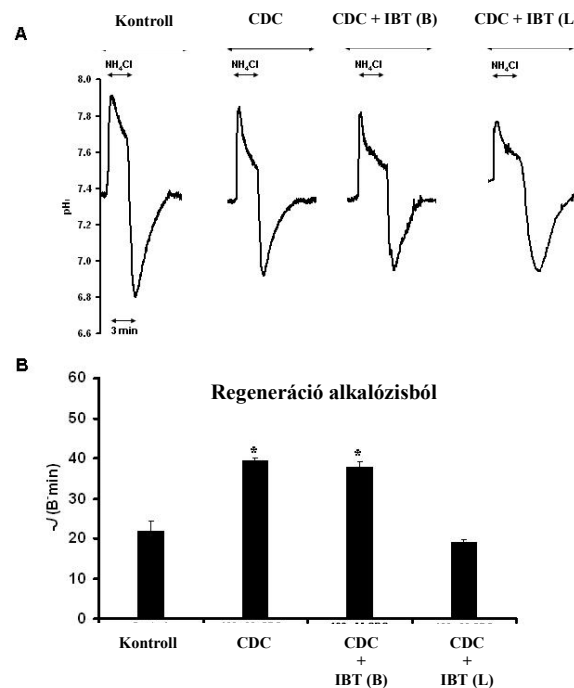
A patch clamp technika egész sejtek konfigurációjának felhasználásával kimutattuk, hogy 0.1 mM CDC hatására fokozódik a duktális sejteken keresztül folyó  $\text{K}^+$  ionáramok nagysága. Különböző  $\text{K}^+$  csatorna inhibitorok segítségével kimutattuk, hogy a CDC által aktiválta  $\text{K}^+$  konduktancia, a nagy-konduktanciájú  $\text{Ca}^{2+}$ -aktiválta  $\text{K}^+$  csatorna vagy más néven BK csatorna gátlószerevel, iberiotoxin-nal (IBT; 100 nM) teljes mértékben gátlható volt (1. ábra).



**1. ábra. Az iberiotoxin hatása a nagy-konduktanciájú  $\text{Ca}^{2+}$ -aktiválta  $\text{K}^+$  csatornákra.** (A) Reprezentatív  $\text{K}^+$  ionáramok a kezelés előtt (i), CDC-vel történő kezelést követően (ii) illetve iberiotoxin (IBT) (iii) jelenlétében. (B) Áram/feszültség (I/V) grafikon. A négyzet az alap áramot, a gyémánt a CDC-stimulált áramot, a háromszög pedig az IBT kezelést reprezentálja. (C) A CDC és IBT hatása + 60 mV-nál mért áram denzitásra. CDC: kenodezoxikólsav, IBT: iberiotoxin. \*= $p \leq 0.05$  vs. Kontroll.

A következő lépésben megvizsgáltuk, hogy a CDC  $\text{HCO}_3^-$  szekréciót stimuláló hatása a BK csatornák aktiválásán keresztül valósul-e meg. Ehhez IBT (100 nM) jelenlétében vizsgáltuk a CDC szekréciót stimuláló hatását intakt pankreász duktuszokon a mikrofluorometriás technika felhasználásával. A bikarbonát szekréció nagyságára az alkalózisból történő regeneráció mértékéből következtettünk.

Eredményeink azt mutatták, hogy a bazális oldal felől adott IBT nem befolyásolta a CDC hatását, ezzel szemben, a lumenális oldal felől adva, teljes mértékben megszüntette a CDC  $\text{HCO}_3^-$  szekrécióra kifejtett stimuláló hatását (2. ábra). Továbbá kimutattuk, hogy a lumenális membrán felől adott IBT nem befolyásolja a szekretin-, lumenális ATP- vagy carbachol-indukálta  $\text{HCO}_3^-$  szekréciót. Eredményeink azt mutatják, hogy a BK csatornák aktivációja fontos szerepet játszik a CDC-stimulált szekrécióban illetve, hogy ezek a csatornák feltehetőleg a ductusok lumenális membránjára lokalizálódnak.



**2. ábra. A lumenális membrán felől adott IBT gátolja a CDC szekréciót stimuláló hatását.** (A) Reprezentatív pH görbék a kontroll, lumenálisan adott CDC, CDC + bazális IBT illetve CDC + lumenálisan adott IBT jelenlétében. (B) A  $\text{HCO}_3^-$  szekréció mértékét ( $-J(\text{B min})$ ) az alkalózisból történő pH regeneráció mértékéből becsültük meg lineáris regressziós analízis segítségével. B: bazális, L: lumenális.  $*=p \leq 0.05$  vs. Kontroll.

Mivel eredményeink azt sugallták, hogy a CDC-stimulálta szekréció a BK csatornák aktivációján keresztül valósul meg, feltételeztük, hogy a BK csatornák aktiválása egy farmakológiai vegyülettel, hasonlóképpen aktiválná a  $\text{HCO}_3^-$  szekréciót. Ehhez megvizsgáltuk egy specifikus BK csatornaaktiváló, NS11021 hatását a  $\text{HCO}_3^-$  szekrécióra az alkalózisból történő regeneráció vizsgálatával. A lumenális membrán felől adott 3  $\mu\text{M}$  NS11021 fokozta a ductális  $\text{HCO}_3^-$  szekréciót, míg az NS11021 inaktív formája, az NS13558 nem befolyásolta a szekréció mértékét.

A következő lépésben immunhisztokémiai eljárással sikerült kimutatnunk a BK csatornák jelenlétét a ductális sejtek lumenális membránján, míg az acinusokban negatív festődést kaptunk. A következőkben azt vizsgáltuk, hogy a CDC hatása az újonnan felfedezett epesav receptor, a Gpbar-1 közvetítésével valósul-e meg. A Gpbar-1 receptor ellen kifejlesztett ellenanyag pozitív festődést mutatott az acinusokban. A ductális sejtekben azonban nem sikerült ezen receptor jelenlétét kimutatnunk. Ezzel szemben reverz transzkripció PCR technikával sikerült kimutatnunk a az organikus anion transzporter-2 (Oatp-2) epesav transzporter jelenlétét tengerimalac pankréaszban illetve a fő pankréász vezetékben.

Végül pedig elektronmikroszkóp felhasználásával megvizsgáltuk, hogy az epesavas kezelés okoz-e morfológiai eltéréseket a pankréasz ductális sejtek sejtorganellumaiban vagy a

plazmamembrán integritásában. A pankreász duktuszok CDC-vel (0.1 mM) történő 10 perces inkubálása nem befolyásolta a sejten belüli organellumokat, morfológiai elváltozást nem tapasztaltunk

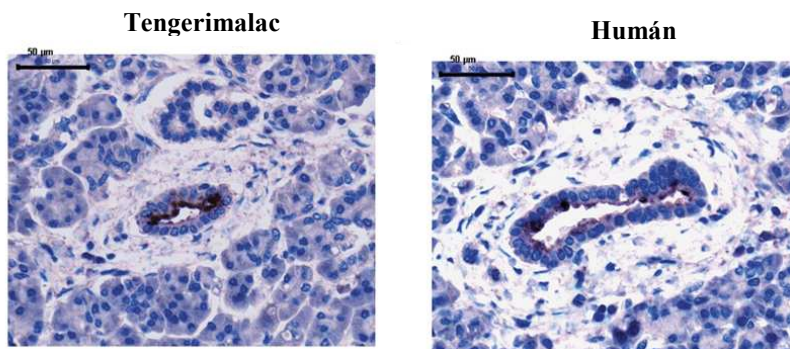
Eredményeink **összefoglalás**aként elmondhatjuk, hogy:

- 1.) Kimutattuk egy  $\text{Ca}^{2+}$ -aktiválta  $\text{K}^+$  csatorna (BK) jelenlétét tengerimalac pankreász duktális sejtek lumenális membránján
- 2.) Megállapítottuk, hogy a BK csatornák alapvető szerepet játszanak a kis koncentrációban adott CDC duktális  $\text{HCO}_3^-$  szekréciót stimuláló hatásában
- 3.) A BK csatorna aktivátor, NS11021 stimulálta a duktális  $\text{HCO}_3^-$  szekréciót.

Hipotézisünk szerint a duktális  $\text{HCO}_3^-$  szekréció stimulációja védekező funkciót jelenthet a biliáris akut pankreatitisz kezdeti szakaszában azáltal, hogy kimossa a különböző toxikus faktorokat, így az epesavakat a duktális fából, megakadályozva ez által a pankreász károsodását. Eredményeink azt mutatják, hogy a BK csatornák aktivációja terápiás lehetőséget jelenthet az akut pankreatitisz kezelésében.

### **A tripszin hatásának karakterizálása a pankreász duktális sejtek működésére**

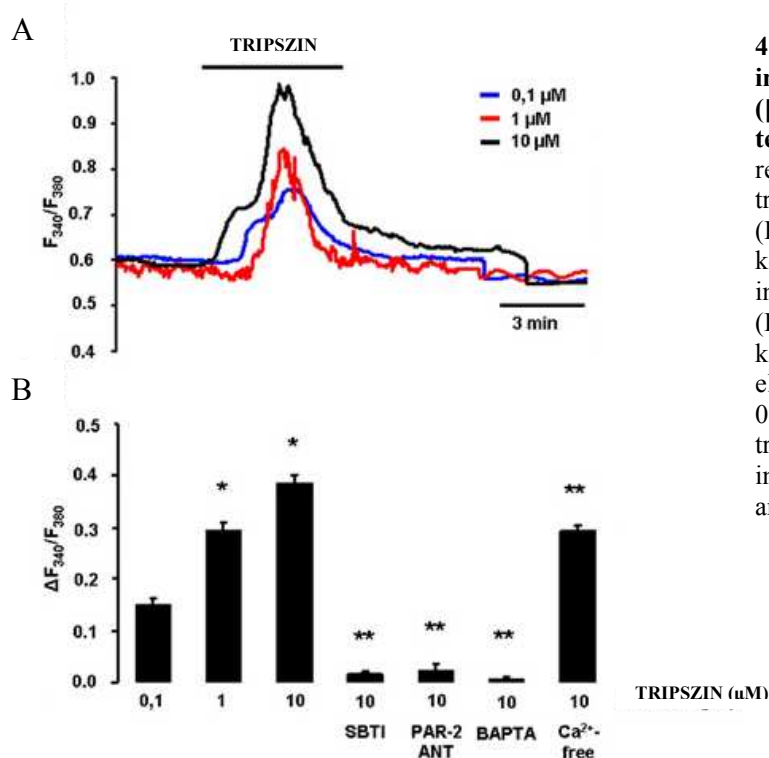
Első lépésben megvizsgáltuk, a PAR-2 receptor kifejeződését tengerimalac pankreász duktális sejtekben illetve humán pankreászban. Immunhisztokémiai módszer erőteljes PAR-2 festődést mutatott mind a tengerimalac pankreász duktuszokban. Az intra/interlobuláris duktuszok festődésének denzitometriás összehasonlítása nagy mennyiségű PAR-2 expressziót mutatott az intralobuláris duktuszokban, míg a nagyobb, interlobuláris duktuszokban alig volt detektálható ezen receptor kifejeződése. A humán pankreász immunhisztokémiai vizsgálata hasonló festődési mintázatot mutatott a tengerimalac pankreászához.



**3. ábra. PAR-2 lokalizációja tengerimalac és humán pankreász duktuszokban.** A PAR-2 receptor a kis méretű intra/interlobuláris duktuszok lumenális membránjára lokalizálódik. 400X-os nagyítás, vonalas mérték: 50  $\mu\text{m}$ .

A következő kísérletsorozatban megvizsgáltuk a tripszin, a tripszin aktiváló peptid, PAR-2 AP, a tripszin agonista és antagonist (PAR-2-ANT) hatását a duktális sejtek intracelluláris kalcium szintjére és pH-jára. Kimutattuk, hogy a PAR-2-AP és a tripszin dózisfüggő intracelluláris kalcium szignalizációt indukál a tengerimalac pankreász duktuszokban. A lumenális membrán felől adott PAR-2-AP hatását (1, 10 és 100  $\mu\text{M}$ ) mind a PAR-2 antagonist (10  $\mu\text{M}$ ) mind pedig a kalcium kelátor BAPTA-AM (40  $\mu\text{M}$ ) teljes mértékben kivédte, míg az extracelluláris oldatból történő kalcium elvonása nem befolyásolta. A lumenális membrán felől adott tripszin (0.1, 1 and 10  $\mu\text{M}$ ) hatása megegyezett a PAR-2-AP hatásával. A tripszin generálta kalcium szignált mind a szójabab tripszin inhibitor (SBTI, 5  $\mu\text{M}$ ), mind a PAR-2-ANT (10  $\mu\text{M}$ ) mind pedig a BAPTA-AM (40  $\mu\text{M}$ ) előkezelés gátolta.

Ezen eredmények alapján megállapíthatjuk, hogy a tripszin intracelluláris kalcium koncentrációra ( $[Ca^{2+}]_i$ ) kifejtett hatása a PAR-2 receptorok aktiválásán keresztül valósul meg (4. ábra).



**4. ábra. A tripszin hatása az intracelluláris kalcium koncentrációra ( $[Ca^{2+}]_i$ ) mikroperfundált tengerimalac duktuszokban.** (A) A reprezentatív görbék 0.1, 1 illetve 10  $\mu M$  tripszin hatását mutatják a  $[Ca^{2+}]_i$ -re. A (B) ábrán látható a különböző koncentrációban adott tripszin, tripszin inhibitor (SBTI), tripszin antagonist (PAR-2 ANT), illetve a BAPTA-AM kezelés és az extracelluláris kalcium elvonás hatása a  $[Ca^{2+}]_i$ -re. \*= $p \leq 0.05$  vs. 0.1  $\mu M$  tripszin, \*\*= $p \leq 0.05$  vs. 10  $\mu M$  tripszin. SBTI: szójabab tripszin inhibitor, PAR-2 ANT: PAR-2 antagonist.

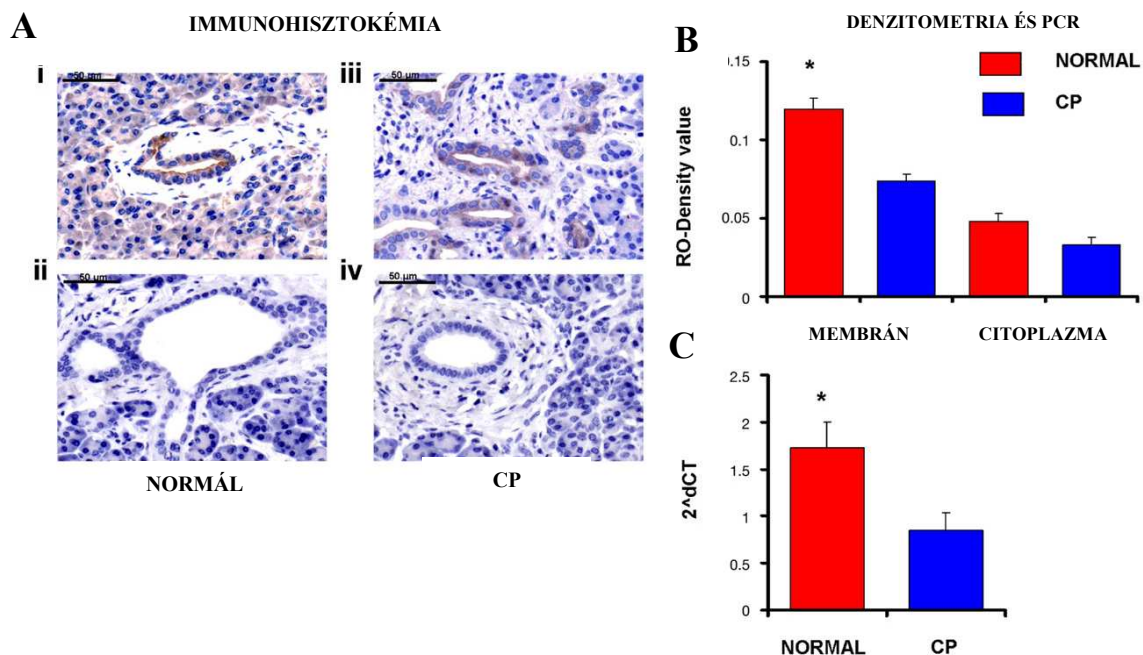
Az intracelluláris pH-ban ( $pH_i$ ) bekövetkező változások detektálása a pH-függő fluoreszcens festék, BCECF-AM felhasználásával történt. A PAR-2-AP (10  $\mu M$ ) és a tripszin (10  $\mu M$ ) dózisfüggő alkalizációt indukál a duktális sejtekben. Ezen alkalizáció feltehetőleg az apikális membránon keresztüli bikarbonát kiáramlás gátlásán keresztül jön létre. A PDEC SBTI-vel (5  $\mu M$ ), PAR-2-ANT-val (10  $\mu M$ ) vagy BAPTA-AM-el (40  $\mu M$ ) történő előkezelése kivédte a tripszin ezen gátló hatását. Fontos megjegyezni, hogy a  $Cl^-/HCO_3^-$  kicserélőt gátló  $H_2DIDS$  adása illetve a  $Cl^-$  elvonása a külső oldatból csökkentette, de nem szüntette meg a tripszin hatását az intracelluláris  $pH_i$ -ra, amely arra utal, hogy a tripszin mind a  $Cl^-$ -függő mind pedig a  $Cl^-$ -független bikarbonát szekretáló mechanizmusokat gátolja.

A következőkben a patch clamp technika whole cell konfigurációjának a felhasználásával megvizsgáltuk, hogy a tripszin és a többi farmakológiai ágens hatását a CFTR  $Cl^-$  áramokra. A PAR-2-AP (10  $\mu M$ ) és a tripszin (10  $\mu M$ ) az alap CFTR áramokat nem, viszont a forskolin-aktiválta CFTR áramokat több mint 50%-al csökkentette. Mindkét esetben a gátlás irreverzibilis volt. SBTI-vel (5  $\mu M$ ) vagy PAR-2-ANT-val (10  $\mu M$ ) történő előkezelés teljesen megszüntette a tripszin ezen gátló hatását, amely arra utal, hogy a tripszin a CFTR  $Cl^-$  áramokat a PAR-2 receptor aktiválásán keresztül gátolja.

A következő lépésben megvizsgáltuk, hogy befolyásolja a duktális pH-ban bekövetkező változás a tripszinogén autoaktivációját. A tripszinogén autoaktivációját a pH csökkenés (8.5-ről 7-re) szignifikánsan megemelte. Ezt követően az autoaktiváció egy lassú csökkenést mutatott pH 7.0 és 6.0 között. Annak érdekében, hogy kizárjuk, hogy az autoaktivációban bekövetkező változás a pufferek különböző ionösszetételével magyarázható, megismételtük a

kísérletet 100mM NaCl-ot tartalmazó pufferben is. Bár a reakció összességében lassabban ment végbe NaCl jelenlétében, az autoaktiváció ugyanolyan pH függést mutatott.

Végül pedig megvizsgáltuk a PAR-2 jelenlétét krónikus pankreatitisz-ben. Az 5. ábrán látható, hogy krónikus pankreatitiszben csökkent mind fehérje mind pedig mRNA szinten a PAR-2 kifejeződése. A PAR-2 citoplazmába történő transzlokációban nem tapasztaltunk eltérést a normál és krónikus pankreatitiszben szenvedő betegekből vett szöveti mintákban.



**5. ábra. PAR-2 kifejeződése normál és krónikus pankreatitiszben szenvedő betegek pankréaszában.** Az (A) ábrán a normál (i és ii) illetve a krónikus pankreatitiszes (iii és iv) szövetminták immunohisztokémiai festése látható PAR-2 elsődleges ellenanyag jelenlétében (i és iii) illetve hiányában (ii és iv). (B) Relatív optikai denzitás.  $*=p \leq 0.05$  vs. CP membrán. (C) ábrán a PAR-2 mRNA expressziójának analízise.  $*=p \leq 0.05$  vs. CP. CP: krónikus pankreatitisz. Vonalas mérték: 50  $\mu$ m.

Eredményeink alapján arra következtetünk, hogy a pankréasz duktális sejtek  $\text{HCO}_3^-$  szekréció alapvető szerepet játszik a tripszinogén autoaktivációjának a kivédésében. Azonban, ha a tripszin jelen van a duktális fában a duktális sejtek lumenális membránjára lokalizálódó PAR-2 receptorok aktiválódnak, amely intracelluláris kalcium felszabaduláshoz és megemelkedett intracelluláris kalcium szinthez vezet. Ezen folyamat gátlólag hat mind a lumenális anion kicserélőre mind pedig a CFTR  $\text{Cl}^-$  csatornára, amely a  $\text{HCO}_3^-$  szekréció csökkenését fogja eredményezni. A csökkent szekréció miatt egyrészt lassabban jutnak el a zimogének a duodénumba, másrészt az elégtelen  $\text{HCO}_3^-$  szekréció miatt lecsökken a duktális pH, amely elidítja a tripszinogén idő előtti autoaktivációját. A tripszinogén autoaktivációja pedig tovább gátolja az anion kicserélő működését beindítva ezáltal egy ördögi kör, amely végső soron a pankreatitisz kialakulásához vezet.